



microRNA-21が司るマクロな組織構築基盤の解明

著者	番匠 俊博
号	11
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第275号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58178

ばんじょう としひろ

氏名（本籍地）	番匠 俊博
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第275号
学位授与年月日	平成26年3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	microRNA-21 が司るマクロな組織構築基盤の解明
博士論文審査委員	（主査） 教授 小椋 利彦 教授 水野 健作 教授 杉本 亜砂子

論文内容の要旨

第1部 血流に誘導される *miR-21* の発現はゼブラフィッシュの心臓弁形成を制御する

<研究背景>

心臓の拍動や血流が生み出す力刺激は心臓形成に必須である。心拍の停止や血流の攪乱は、心臓の形成不全を引き起こす。例えば、発生期ゼブラフィッシュの心臓の入口にビーズを移植して血流を物理的に遮断すると、心臓弁形成不全などヒト先天性心疾患に類似した表現形を呈する¹。ヒトの場合も、両親から受け継ぐ遺伝子情報に異常が無いにも関わらず先天性心疾患を持つ新生児が多い。これは、胎児の心発生期に何かしらの理由で血流の攪乱や心拍の異常が起こり、心奇形に結びついたという可能性が提唱されている。しかしながら、力刺激がどのように遺伝子発現を調節して心臓形成に寄与するのか詳細な分子機構は不明であった。

MicroRNAs (miRs) は長さが 20-25 塩基ほどのノンコーディング RNA であり、標的 mRNA の翻訳制御によって様々な細胞内シグナリングを調節する。いくつかの miR は心臓に発現して、心臓の発生や生理機能、病態に関与する²。また興味深いことに、組織や細胞への力刺激に速やかに応答して発現量を変化させる miR も存在する³。そのため miR は力刺激と心臓形成を繋ぐ因子の一つと考えられる。発生期のゼブラフィッシュ心臓に発現する miR を探索したところ、*miR-21* が心臓弁特異的に発現していることを見出した。本研究は、血流動態と *miR-21* の発現の関係性を明らかにすると共に、心臓弁形成におけるその機能解析を目的としている。

<結果および考察>

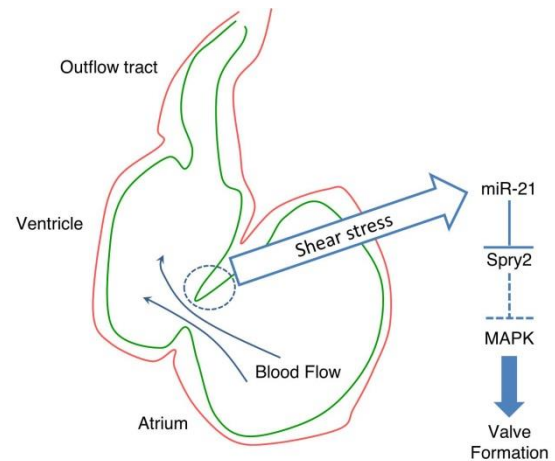
ゼブラフィッシュ *miR-21* の心臓弁での発現は、同調した心拍と血流が確立される受精後 36 時間のステージから認められるようになる。その後も発生の進行と共に、*miR-21* は弁形成領域に発現し続けた。この弁形成領域は狭窄し、血流による高いせん断応力が負荷されるため、*miR-21* はせん断応力に応答していることが想定された。この可能性を確認するため、ゼブラフィッシュの心拍を Myosin ATPase inhibitor の 2,3-Butanedione monoxime (BDM) を用いて停止させた。心拍を停止させて 12 時間経過すると、弁での *miR-21* の発現が消失し、反対に薬剤を洗い流して心拍を再開させると、わずか 1 時間でその発現が回復した。また、アドレナリンを用いて胚の血流動態を変化させて末梢血管に負荷されるせん断応力を上昇させると、頭部血管での異所的な *miR-21* の発現が認められるようになった。すなわちゼブラフィッシュの *miR-21* は血流が生み出すせん断応力に依存していることになる。さらにヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs) に 2 Pa の流れ負荷をかけると、1 時間以内に *miR-21* の発現が上昇したことから、哺乳類においても *miR-21* の流れへの応答能が保存されているこ

とが確認された。

次に *miR-21* に対するアンチセンスモルフォリーノを用いて機能阻害実験を行った。*miR-21* ノックダウン胚 (21MO) では弁の低形成が見られ、通常の弁形成領域に強く見られる細胞増殖が減弱していた。この表現形は心拍を停止させて発生させた胚と類似しており、血流に応答する *miR-21* が弁形成に必須であることを示している。

弁形成における *miR-21* の機能をさらに詳細に解析するため、その直接の標的因子を探索した。その結果、MAPK カスケードの阻害活性をもつ *sprouty2* (*spry2*) が *miR-21* の直接標的の一つであった。*miR-21* は *spry2* mRNA に結合して分解する。*spry2* 上の *miR-21* の標的配列を覆うモルフォリーノ (Target protector morpholino; TP MO) で、*spry2* mRNA を *miR-21* の抑制効果から保護するとやはり弁の形成不全が見られた。また、通常の弁形成領域では MAPK カスケードが活性化しているが、21MO・血流の停止・*spry2* TP MO のいずれの場合でもその活性化が抑制された。

以上のことから、血流→*miR-21* の誘導→*spry2* の抑制→MAPK 活性化のシグナリングを通じ、血流依存的なゼブラフィッシュ心臓弁形成への *miR-21* の関与が示された⁴ (右図)。この研究結果は、力刺激が器官形成に必要な要素であることを改めて強調すると共に、*miR-21* が力刺激伝達経路で重要な機能を担うことを新たに証明するものである。



<参考文献>

1. J.R.Hove et al., Nature. 2003 Jan 9;421(6919):172-7.
2. N.Liu et al., Dev Cell. 2010 Apr 20;18(4):510-25.
3. E.V.Rooij et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 28;103(48):18255-60.
4. T.Banjo et al., Nat Commun. 2013;4:1978.

第2部 *miR-21* 欠損マウスにおける皮膚創傷治癒の促進

<研究背景>

損傷した皮膚の修復は非常にダイナミックで複雑なプロセスである。様々な細胞が多様なシグナリング経路を介して傷の治癒に関与するが、修復された皮膚では再構築されたコラーゲンの配向が周囲の組織とは不均一で、毛包の再生もほとんどおこらないため、外から瘢痕組織(傷跡)として認識できる。外科手術や怪我などで瘢痕が残る場面は日常で多くあることから、皮膚修復の過程を解明し、瘢痕形成を抑えようという医学的な試みが盛んになされている。その鍵の一つとされているのが、受傷後に惹起される炎症の抑制である。なぜなら、機能的な炎症細胞が存在しない変異マウスでは皮膚の創傷治癒が促進し、瘢痕形成が抑制されるためである⁵。さらに、胎生期の皮膚創傷治癒部位では瘢痕が形成されずに皮膚組織が完全に再生するが、この場合も損傷部位に炎症細胞の集積が見られない⁶。しかし創傷治癒と炎症の分子メカニズムは不明な点が多い。

様々な組織損傷モデルにおいて *miR-21* の発現が上昇することが知られている。損傷したゼブラフィッシュのヒレや心臓⁷、マウスの心筋梗塞モデル⁸、腎不全モデル⁹など損傷組織での *miR-21* の存在量が増加することが報告されており、皮膚創傷治癒過程での *miR-21* の関与が想定された。本研究では皮膚創傷治癒過程における *miR-21* の機能に迫った。

<結果および考察>

通常は無傷な皮膚では毛包において *miR-21* のシグナルがわずかに見られるのみで、上皮には発現していなかった。マウス背部を除毛後、1cmの全層切り込み損傷を与えると、受傷後1日(1 day-post injury, 1 dpi)から傷周縁部の上皮や、組織修復の場である肉芽組織での *miR-21* の発現上昇が観察された。そこで、全身で *miR-21* を欠損した *miR-21* KO マウス (21KO) を作成して創傷治癒過程の *miR-21* の機能解析を試みた。ゼブラフィッシュの 21MO の場合と異なり、21KO マウスは正常に発生・成長・生殖して一見異常は示さなかった。しかし 21KO マウスでは、損傷後の皮膚の再上皮化が通常よりも速く進行した。3 dpi の時点で、野生型マウスは傷の 50%程度の再上皮化が完了したのに対し、21KO マウスは 90-100%の再上皮化が認められた。さらに 14 dpi で、21KO マウスの肉芽組織は通常よりも小さくなり、 α smooth muscle actin (α Sma) などの線維化マーカーの発現も低下していたことから、21KO マウスでは瘢痕形成が抑制されたといえる。瘢痕形成抑制の要因を探るために、修復途中の皮膚の遺伝子発現プロファイルを解析すると、21KO マウスでは野生型よりもいくつかの炎症関連遺伝子群の発現

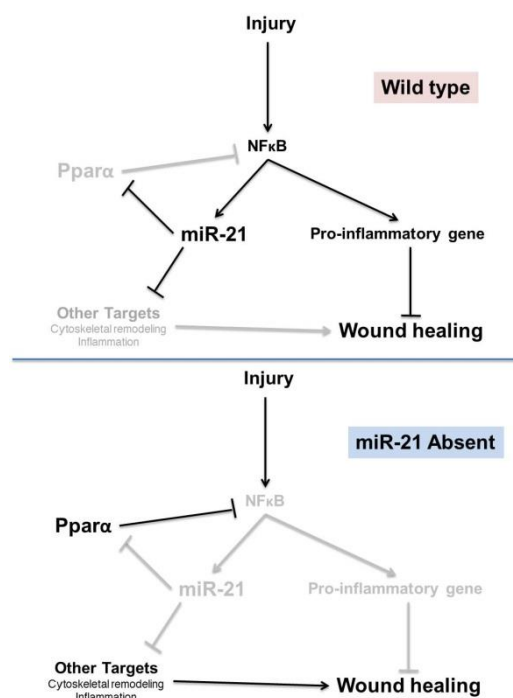
低下が認められた。この結果と一致して、損傷部に集簇する好酸球やマスト細胞などの炎症細胞数も 21KO マウスでは減少していた。*miR-21* 欠損のもとでは炎症反応が緩和し、傷の治癒が促進したと考えられる。

miR-21 の標的因子を探索したところ、*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (*Ppara*) が一つの候補であった。実際、野生型マウスに比べ 21KO マウスでは、*miR-21* の抑制を免れた *Ppara* の発現が増加していた。*Ppara* は Nuclear factor-kappa B (NFκB) の抑制などを介して、抗炎症作用を発揮する核内受容体であり、実際に *Ppara* アゴニストはアトピー性皮膚炎の炎症緩和へ使用される¹⁰。また *Ppara* KO マウスでの創傷治癒の遅延が報告されている¹¹。以上より、21KO マウスでは *Ppara* による抗炎症作用が増強され、皮膚の治癒が促進したと考察できる (右図)。

培養したヒト皮膚組織に mimic *miR-21* を投与すると再上皮化が遅延するという報告もあり、ヒトにおいても *miR-21* の抑制で創傷治癒を促進できる可能性が期待される。よって本研究成果は、瘢痕を残さない創傷治癒へと応用できるかもしれない。例えば、皮膚の損傷部位に *miR-21* の機能を阻害する anti-*miR-21* や *miR-21* デコイなどの核酸医薬品と抗生剤を併用すれば、損傷部の炎症緩和と、治癒の促進が期待できるだろう。

<参考文献>

5. P.Martin et al., Curr Biol. 2003 Jul 1;13(13):1122-8.
6. Wulff BC et al., J Invest Dermatol. 2012 Feb;132(2):458-65.
7. Yin VP et al., Dev Biol. 2012 May 15;365(2):319-27.
8. Patrick DM et al., J Clin Invest. 2010 Nov;120(11):3912-6.
9. Chau BN et al., Sci Transl Med. 2012 Feb 15;4(121):121ra18.
10. Dubrac S, Schmuth M. Dermatoendocrinol. 2011 Jan;3(1):23-6.
11. Michalik L et al., J Cell Biol. 2001 Aug 20;154(4):799-814.



論文審査結果の要旨

心臓発生、循環器系の恒常性の維持は、血流によるせん断応力、心拍による伸展刺激等、機械的、力学的刺激が調節パラメーターとして重要な意味を持っている。このことは同時に、心臓、血管の細胞が、力学的な刺激を受容し、応答していることを意味している。しかし、細胞がどのように物理的な力を感知し、それを生化学的な反応に変換するか、その分子メカニズムはほとんど解明されていない。

番匠俊博君は、力学刺激が加わった細胞で急速に誘導される microRNA-21 (miR-21) を焦点に、ゼブラフィッシュ心臓の弁形成の制御に大きな知見をもたらした。miR-21 は、弁形成細胞に、せん断応力依存的に発現誘導される。そして、miR-21 の機能阻害は、弁のほぼ完全な欠損を来す。この表現系は、心拍／血流を止めた心臓と同じである。また、miR-21 は、Sprouty、Pdc4 など、細胞増殖抑制因子の発現を負に制御している。以上の知見から、血流によるせん断応力が、弁形成心内膜細胞に miR-21 を誘導し、細胞増殖抑制因子を抑制することで細胞増殖を正に制御して弁形成を行うことを意味している。

加えて、miR-21 ノックアウトマウスの皮膚損傷治癒をモデルに、miR-21 が、いわゆる wound healing に中心的な役割を担うことを見いだした。miR-21 の働きが無いと、皮膚損傷が速やかに、しかも瘢痕を形成せずに治癒するという知見は、医学的にも大きな意味を持っている。

以上の研究を、番匠俊博君はほぼ単独で成し遂げたのであり、これは、彼が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、番匠俊博君提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。